

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP05/000860

International filing date: 28 January 2005 (28.01.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: EP
Number: 04002032.3
Filing date: 30 January 2004 (30.01.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 08 March 2005 (08.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



**Europäisches
Patentamt**

**European
Patent Office**

**Office européen
des brevets**

Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterlagen stimmen mit der ursprünglich eingereichten Fassung der auf dem nächsten Blatt bezeichneten europäischen Patentanmeldung überein.

The attached documents are exact copies of the European patent application described on the following page, as originally filed.

Les documents fixés à cette attestation sont conformes à la version initialement déposée de la demande de brevet européen spécifiée à la page suivante.

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

04002032.3

Der Präsident des Europäischen Patentamts;
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets
p.O.

R C van Dijk



Anmeldung Nr:
Application no.: 04002032.3
Demande no:

Anmeldetag:
Date of filing: 30.01.04
Date de dépôt:

Anmelder/Applicant(s)/Demandeur(s):

LESAFFRE et Compagnie
41, rue Etienne Marcel
F-75001 Paris
FRANCE

Bezeichnung der Erfindung/Title of the invention/Titre de l'invention:
(Falls die Bezeichnung der Erfindung nicht angegeben ist, siehe Beschreibung.
If no title is shown please refer to the description.
Si aucun titre n'est indiqué se referer à la description.)

Nouvelles levures de panification résistantes a une concentration elevee en sucre
et a la presence d'acides organiques faibles

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed /Priorité(s)
revendiquée(s)
Staat/Tag/Aktenzeichen/State/Date/File no./Pays/Date/Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation/International Patent Classification/
Classification internationale des brevets:

A21D/

Am Anmeldetag benannte Vertragstaaten/Contracting states designated at date of
filing/Etats contractants désignées lors du dépôt:

AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IT LU MC NL
PT RO SE SI SK TR LI

**NOUVELLES LEVURES DE PANIFICATION RESISTANTES
A UNE CONCENTRATION ELEVEE EN SUCRE
ET A LA PRESENCE D'ACIDES ORGANIQUES FAIBLES**

5 DOMAINE DE L'INVENTION

La présente invention est relative à de nouvelles souches de levures de panification, performantes sur pâtes fortement sucrées, et éventuellement en présence d'inhibiteurs de moisissures ; elle vise également, en tant que produits industriels
10 nouveaux, les levures de panification fraîches ou sèches obtenues à partir de ces souches.

DESCRIPTION DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE

15 Actuellement, le marché des produits de panification plus ou moins fortement sucrés et/ou contenant des inhibiteurs de moisissures représente un pourcentage important du marché mondial.

Il existe des souches de levure de panification dites « rapides », adaptées aux pâtes sans sucre ou peu sucrées, c'est-à-dire ne contenant pas plus de 7% en masse
20 de sucre par rapport à la farine. Les performances fermentaires de ces levures diminuent fortement lorsque la teneur en sucre de la pâte atteint ou dépasse 15% en masse par rapport à la farine.

Les produits cuits de panification, en particulier quand ils sont vendus sous forme de tranches, sont sujets au développement de moisissures au bout de quelques
25 jours de stockage. En conséquence, il est souvent essentiel d'ajouter à la composition des pains destinés à être tranchés au cours de leur fabrication, des agents anti-moisissures ou anti-fongiques appartenant à la famille des acides organiques faibles (ayant un pKa de 3 à 6) et de leurs sels, comme l'acide acétique, l'acide propionique, l'acide sorbique ou leurs sels, ou d'autres conservateurs utilisés de façon classique
30 dans le domaine de la panification.

Ces acides ont un effet inhibiteur plus ou moins important sur les levures de panification. Dans la pratique, c'est le propionate de calcium qui est le plus utilisé comme inhibiteur de moisissures dans la panification.

5 DEFINITION DE L'INVENTION

La présente invention permet de remédier au moins partiellement aux effets inhibiteurs d'une teneur élevée en sucres dans la pâte, éventuellement en présence d'un inhibiteur de moisissures tel que décrit ci-dessus. La présente invention est relative à de nouvelles souches de levure de panification, et de manière plus générale à une nouvelle famille de souches de levure de panification, correspondant à des levures performantes sur pâtes sucrées, additionnées ou non d'inhibiteurs de moisissures comme les acides organiques faibles et/ou leurs sels. Grâce aux différentes souches de levure appartenant à cette famille, le « proof time », mesuré dans différentes recettes panaires, se trouve diminué par l'emploi d'une de ces nouvelles souches. Le proof-time est défini comme le temps nécessaire pour que la pâte boulangère atteigne une certaine hauteur dans le moule et puisse être cuite

Une des nouvelles souches de *Saccharomyces cerevisiae* ainsi obtenue a été déposée le 12 février 2003 auprès de la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, F-75724 Paris Cedex 15, France) sous le numéro I-2971.

Deux autres nouvelles souches de *Saccharomyces cerevisiae* ainsi obtenue ont été déposées le 25 novembre 2003 auprès de la CNCM, sous les numéros I-3142 et I-3143.

La présente invention concerne les trois souches décrites ci-dessus et l'ensemble des souches appartenant à la même famille, c'est-à-dire toutes les souches qui partagent les mêmes propriétés que les trois souches décrites ci-dessus, ainsi que toutes les souches qui peuvent être dérivées de cette famille de souches, et en particulier des trois souches déposées, par toute technique de transformation quelle qu'elle soit, comme par exemple la mutagenèse et la transformation génétique.

DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

- Un objectif de la présente invention est de fournir des souches, donnant après culture industrielle une levure de panification possédant une très grande tolérance aux sucres, ou encore une très grande tolérance à une pression osmotique élevée, en présence ou non d'au moins un inhibiteur de moisissures, c'est-à-dire des souches de levure adaptées à des concentrations élevées en saccharose, en glucose, en fructose, ou encore en un mélange de ces sucres et éventuellement d'autres sucres fermentescibles, en présence ou non par exemple de propionate de calcium.
- Les levures, objet de l'invention, ont été obtenues par croisements systématiques entre elles des souches utilisées pour produire des levures de panification du commerce (souches du commerce) ou des centres de collections publics connues comme étant très osmotolérantes et des souches du commerce ou des centres de collections publiques connues comme étant plutôt osmotolérantes et peu sensibles à la présence des acides organiques faibles ou de leurs sels, utilisés comme inhibiteurs de moisissures. Le programme de sporulation et de croisement a été réalisé selon les techniques classiques comme celles enseignées dans le chapitre 7 « Sporulation and Hybridization of Yeast » par R.R. Fowell, de l'ouvrage « The Yeasts », Volume 1, édité par A.H. Rose et J. S. Harrison, 1969- Academic Press.
- Les souches obtenues par ce programme d'hybridation ont été multipliées en laboratoire par des méthodes conventionnelles, avec adaptation à la présence d'acide(s) organique(s) faible(s) comme enseigné dans le brevet US n° 4 318 991, incorporé par référence.
- Les levures ainsi obtenues à partir des souches issues du programme de croisement ci-dessus défini ont été sélectionnées par des mini-tests de panification en schéma NO-TIME DOUGH, c'est-à-dire en schéma direct où il n'y a pratiquement pas de première fermentation entre un pétrissage intensif et la division de la pâte, les pâtons obtenus étant fermentés en moule entre 35°C et 40°C, puis cuits. Cette dernière fermentation, qui est la fermentation essentielle dans un tel schéma, est appelée « proof » en anglais, « apprêt » en français. Le « proof-time » ou temps d'apprêt est défini comme le temps nécessaire pour que la pâte atteigne une hauteur

donnée dans le moule, correspondant au développement de la pâte souhaitée pour qu'elle soit mise au four.

Les variables dans ces mini-tests de panification ont été :

- le pourcentage en masse de sucre par rapport à la farine (tous les pourcentages étant exprimés en pourcentage dit du boulanger, le pourcentage dit du boulanger étant une méthode de calcul appliquée aux rapports des ingrédients dans laquelle la masse totale de la farine représente toujours 100% et la masse des autres ingrédients est calculée par rapport à cette base de farine) ;

- le pourcentage en masse de propionate de calcium par rapport à la farine.
- Le témoin est une pâte obtenue dans les mêmes conditions et avec une même composition de pâte, si ce n'est qu'elle est ensemencée avec une levure fabriquée dans les mêmes conditions que les souches testées, avec adaptation à la présence d'acide(s) organique(s) faible(s), mais cette fois-ci obtenue avec la souche de levure de boulangerie NCYC 996, déposée à la NCYC (National Collection of Yeast Cultures, Institute of Food Research, Norwich Research Park, Colney, Norwich, NR4 7UA, United Kingdom), et décrite notamment dans le brevet US n° 4 396 632. Cette souche est, depuis une vingtaine d'années, la souche de référence pour obtenir des levures de boulangerie commerciales performantes sur pâtes sucrées contenant ou non des inhibiteurs de moisissures.

- Les critères de sélection utilisés dans une première sélection ont été au moins deux des trois critères suivants, et de préférence les trois critères suivants pris en combinaison :

1. sur pâte contenant 15% de sucre (pourcentage du boulanger) avec ou sans présence de 0,4% de propionate de calcium (pourcentage du boulanger), les souches sélectionnées correspondent aux levures de panification donnant un proof-time au moins équivalent, c'est-à-dire inférieur ou égal au proof-time obtenu avec le témoin ;
2. sur pâte contenant 25% de sucre (pourcentage du boulanger) et 0,4% de propionate de calcium (pourcentage du boulanger), les souches sélectionnées correspondent aux levures de panification donnant un proof-time inférieur d'au moins 5% et de préférence d'au moins 10% au proof-time du témoin ;

3. sur pâte à 40% de sucre (pourcentage du boulanger), les souches sélectionnées correspondent aux levures de panification donnant un proof-time inférieur d'au moins 20%, de préférence d'au moins 30% et de préférence encore d'au moins 35% au proof-time du témoin.

5 Les deux critères de sélection suivants ont été utilisés dans une deuxième sélection en combinaison de manière complémentaire à la première sélection ci-dessus décrite, la souche sélectionnée devant en plus satisfaire un de ces deux critères complémentaires :

- 10 1) Les levures de panification obtenues avec une souche issue de la première sélection doivent être résistantes au séchage, en d'autres termes dans les conditions de séchage décrites dans le brevet EP 0511108 ou le brevet US 5 741 695, incorporés par référence, elles ne doivent pas perdre plus de 30% de leur activité fermentative, à matières sèches constantes, mesurée avec le fermentomètre de Burrows et Harrison dans
15 les tests A₅, A'₅, A₆, A'₆ décrits dans les documents ci-dessus mentionnées EP 0511108 et US 5 741 695.
- 20 2) Les levures de panification obtenues avec une souche issue de la première sélection, dans un schéma SPONGE and DOUGH, tel que défini dans le livre de référence « Bakers Handbook » de E. J. Pyler, publié par Sosland Publishing Co., caractérisé par une étape DOUGH où il est ajouté 25% de saccharose en masse par rapport à la farine totale mise en œuvre dans le SPONGE and DOUGH, donnent par rapport à un DOUGH obtenu dans les mêmes conditions et ensemencé avec une
25 levure de panification obtenue dans les mêmes conditions avec la souche NCYC 996 une durée de proof-time inférieure d'au moins 20%, de préférence d'au moins 30% et encore de préférence d'au moins 40%.

Selon la définition ci-dessus, un « SPONGE and DOUGH » process est un procédé de panification largement pratiqué avec deux étapes de fermentation :

- 30 - une première étape ou SPONGE qui correspond à la fermentation d'une pâte comprenant 50 à 70% de la farine totale mise en œuvre, une partie de l'eau et la totalité de la levure pendant plusieurs heures, en général environ quatre heures,

- une seconde étape ou DOUGH dans laquelle le SPONGE après la fermentation décrite ci-dessus est combiné avec le reste de la farine, le reste de l'eau et les autres ingrédients de la pâte (dont la totalité du saccharose), le mélange ainsi constitué est pétri, divisé, mis en moule et fermenté, cette seconde fermentation en moule correspond au proof, sa durée étant le proof-time, puis cuit.

Une variante de l'invention consiste à utiliser les cinq tests de sélection directement en combinaison et à sélectionner les souches répondant à au moins trois de ces critères, et de préférence à quatre de ces critères de sélection.

- 10 Les procédés de croisement et de sélection ci-dessus décrits ont permis de sélectionner les trois souches déposées au CNCM sous les numéros : I-2971, I-3142 et I-3143.

- 15 Ces trois souches sélectionnées, et les autres souches susceptibles d'être sélectionnées par lesdits procédés de croisement et de sélection permettent d'obtenir au stade industriel des nouvelles levures de panification ayant les propriétés définies par les critères de sélection par rapport aux levures de panification obtenues avec la souche de référence NCYC 996.

- 20 De manière générale, les dites nouvelles levures de panification combinant au moins trois propriétés correspondant aux critères de sélection, et de préférence quatre propriétés définies par les critères de sélection, sont obtenues de la manière suivante avec les nouvelles souches de levure selon l'invention.

- 25 Lesdites souches de levure et la souche de référence NCYC 996 sont utilisées pour la fabrication de levures de panification comme décrit dans le manuel « *Yeast Technology* », 2^{ème} édition, 1991, G. Reed et T.W. Nagodawithana, publié par Van Nostrand Reinhold, ISBN 0-442-31892-8, incorporé par référence.

La fabrication de levure de boulangerie comprend au moins les deux premières étapes de l'ensemble d'étapes suivantes :

- multiplication d'une souche pure de levure de boulangerie en plusieurs stades, d'abord en semi-anaérobiose, puis en aérobie,
- 30 - séparation par centrifugation de la levure de boulangerie ainsi produite de son milieu de culture, avec l'obtention d'une « crème de levure » liquide contenant environ entre 14 et 25% de matières sèches, voire des matières

sèches plus élevées si la crème de levure est mélangée avec des produits osmotiques,

- filtration de la crème de levure liquide ainsi obtenue, en général sur un filtre rotatif sous vide et obtention d'une levure fraîche déshydratée contenant environ 26 à 35% de matières sèches,
- malaxage de ladite levure fraîche déshydratée en vue de l'obtention d'une masse bien homogène,
- extrusion de la levure ainsi obtenue, soit sous forme de pains de levure fraîche, soit sous forme de levure fraîche émietlée commercialisés à environ 30% de matières sèches, soit sous forme de particules, en général de granules, si la levure est destinée à être séchée.
- séchage de manière ménagée, dans un courant d'air chaud, par exemple par fluidisation, des particules de levures obtenues par extrusion,
- emballage.

De préférence, les nouvelles levures selon l'invention sont adaptées, lors de leur dernier stade de multiplication au stress dû aux acides organiques faibles, par des procédés connus comme les procédés décrits dans les brevets US n° 4 318 991 et n° 4 346 115, incorporés par référence, ou la combinaison de ces procédés.

De manière récapitulative, les objets de la présente invention sont :

- chacune des trois nouvelles souches déposées à la CNCM sous les numéros I-2971, I-3142, I-3143.
- les souches appartenant à la même famille de souches que ces trois souches, c'est-à-dire :
 - les souches susceptibles d'être obtenues par le même procédé de croisement et le même procédé de sélection que ces trois souches,
 - les souches partageant les mêmes propriétés que ces trois souches ;
- les souches issues de l'une des souches ci-dessus définies ;
- les nouvelles levures de panification obtenues avec les souches ci-dessus définies ;
- les nouveaux produits de panification obtenus avec les souches ci-dessus définies.

L'exemple suivant sert à illustrer la présente invention et ses avantages, sans pour autant la limiter.

EXEMPLE

5

Les trois souches, NCYC 996 (souche de référence pour l'application visée) et les deux nouvelles souches I-2971 et I-3143, ont été produites sous forme de levure fraîche de panification par un procédé classique de fabrication comme décrit ci-dessus, comprenant lors de la dernière étape de culture une adaptation au stress dû à la présence d'acides organiques faibles selon les enseignements combinés des brevets US n° 4 318 991 et n° 4 346 115.

10

Les levures fraîches de panification à 32% de matières sèches ainsi obtenues ont été utilisées dans un même procédé de panification de type No Time Dough.

Deux recettes différentes ont été testées : la recette 1 contenant 25% en masse (pourcentage du boulanger) de saccharose et 0,4% en masse (pourcentage du boulanger) de propionate de calcium et la recette 2 contenant 40% en masse (pourcentage du boulanger) de saccharose.

15

Les recettes exprimées en pourcentage du boulanger sont données dans le tableau 1.

20

Ingrédient	Recette 1	Recette 2
Farine	100	100
Eau	50	44
Levure	6	9
Matières grasses	7,5	7,5
Améliorant	1	1,5
Saccharose	25	40
Sel	1,7	1,7
Propionate de calcium	0,4	—

Tableau 1

L'améliorant apporte le mélange d'oxydants et de réducteurs, les enzymes ainsi que les émulsifiants classiques permettant une optimisation du processus de fabrication de ce schéma de panification en No Time Dough, une bonne qualité et une bonne conservation des pains obtenus.

5

Le protocole d'essai appliqué aux deux recettes ci-dessus est le suivant :

1. Peser les 6 ou 7 ingrédients solides.
2. Mesurer la température ambiante et la température de la farine.
3. Régler la température de l'eau de manière à obtenir une température de
- 10 pâte de 27°C +/- 0,5°C.
4. Placer les ingrédients dans une cuve Mac Duffy® d'un pétrin HobartA200®.
5. Mélanger lentement en 1^{ère} vitesse pendant 1 min.
6. Démarrer le pétrissage selon le programme suivant :
- 15 * en 1^{ère} vitesse pendant 5 min
- * laisser reposer pendant 5 min
- * en 2^{ème} vitesse pendant 5 min.
7. Obtention d'une pâte ayant une température de 27°C +/- 0,5°C.
8. Pointage de la masse à 23°C pendant 10 min.
- 20 9. Division en pâtons de 320 g.
10. Bouler peu serré et couvrir.
11. Laisser reposer pendant 10 min
12. Mise en moules des pâtons de 320 g
13. Détermination du temps d'apprêt ou du proof time dans un incubateur
- 25 Stéricult® à 40°C et 90% d'humidité relative.
14. Cuisson dans un four à balancelle REED® à 190 °C pendant 22 min.
15. Mesure du volume des pains après un refroidissement d'au moins une heure et appréciation de la note des pains obtenus.

30

Les écarts de proof time entre le témoin et la levure fraîche obtenue à partir de la souche CNCM I-2971 selon l'invention et la levure fraîche obtenue à partir de la souche CNCM I-3143 selon l'invention sont donnés dans le tableau 2 ci-dessous.

	Recette 1	Recette 2
Levure fraîche témoin	T	T
Souche NCYC 996		
Levure fraîche	-11%	-25%
Souche CNCM I-2971		
Levure fraîche	-5%	-35%
Souche CNCM I-3143		

Tableau 2

REVENDEICATIONS

1. Souche de *Saccharomyces cerevisiae* déposée le 12 février 2003 auprès de la CNCM sous le numéro I-2971.
- 5 2. Souche de *Saccharomyces cerevisiae* déposée le 25 novembre 2003 auprès de la CNCM sous le numéro I-3142.
3. Souche de *Saccharomyces cerevisiae* déposée le 25 novembre 2003 auprès de la CNCM sous le numéro I-3143.
- 10 4. Souche de *Saccharomyces cerevisiae* issue de la même famille que les souches décrites selon les revendications précédentes.
5. Levure de boulangerie obtenue par culture d'une souche selon l'une quelconque des revendications précédentes.
6. Pâte boulangère contenant une levure de boulangerie selon la revendication 5.
7. Pâte boulangère selon la revendication 6 caractérisée par le fait qu'elle appartient à la famille des pâtes dans lesquelles la fermentation se fait en présence d'une pression osmotique comme celle régnant dans les pâtes contenant au moins 15% de sucre par rapport à la farine, de préférence au moins 25% de sucre par rapport à la farine et encore de préférence environ 40% de sucre par rapport à la farine.
- 15 8. Pâte boulangère selon la revendication 7 caractérisée par le fait qu'elle contient des inhibiteurs de moisissures, de préférence sous forme d'acides organiques faibles ou leurs sels, et encore de préférence sous forme de propionate.
9. Procédé de préparation d'un produit cuit de panification utilisant la pâte boulangère selon l'une des revendications 6 à 8.
- 20 10. Produit de panification susceptible d'être obtenu par le procédé selon la revendication 9.
- 25

30. Jan. 2004

ABREGE

Souches de levures de panification, performantes sur pâtes fortement sucrées, éventuellement en présence d'inhibiteurs de moisissures ; et levures de panification

5 fraîches ou sèches obtenues à partir de ces souches.

